

Procédé de fabrication de composé comprenant un groupement hydroxyle libre et  
un groupement hydroxyle protégé par une fonction ester  
par réaction enzymatique

5

La présente invention concerne un procédé de fabrication d'un composé comprenant un groupement hydroxyle libre et un groupement hydroxyle protégé par une fonction ester par réaction enzymatique en utilisant une lipase de la 10 classe EC 3.1.1.3. La présente invention concerne également l'utilisation de ce composé comme intermédiaire pour la fabrication de médicaments et de produits pharmaceutiques.

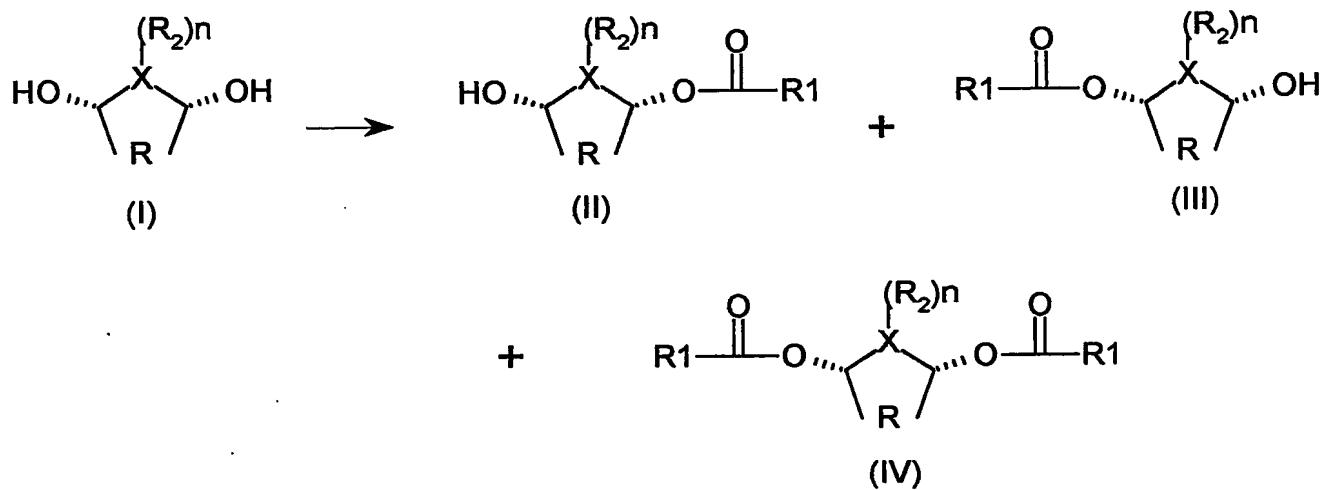
Les synthons chiraux comprenant un groupement hydroxyle libre et un groupement hydroxyle protégé par une fonction ester sont particulièrement 15 intéressants pour la synthèse asymétrique de produits pharmaceutiques. Ainsi, les synthons chiraux du type 1-acétoxy-4-hydroxycyclopent-1-ène sont particulièrement utilisés comme précurseur des prostaglandines, des prostacyclines et des thromboxanes.

Il existe notamment dans l'art antérieur plusieurs procédés développés pour la 20 préparation de composés monoacétate S et/ou R énantiomériquement purs par catalyse enzymatique de la réaction de monoacylation par des enzymes d'origine animale principalement. Par exemple, la pancréatine, une enzyme provenant de pancréas du porc, catalyse la réaction de monoacétylation du 1,4-dihydroxycyclopent-2-ène pour la fabrication de composés monoacétate S 25 énantiomériquement purs.

Toutefois, les autorités nationales réglementaires souhaitent à terme éliminer l'utilisation de produits d'origine animale pour la fabrication de médicaments et des produits pharmaceutiques, pour des raisons de sécurités médicales. Il existe donc un besoin de développer des procédés de fabrication d'intermédiaires 30 chiraux pharmaceutiques en utilisant des enzymes qui ne sont pas d'origine animale.

Par ailleurs, il existe également un besoin de mettre en évidence des enzymes efficaces, notamment à de faibles quantités, permettant d'obtenir une bonne sélectivité des synthons chiraux souhaités.

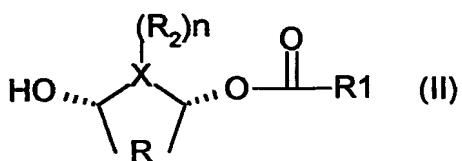
- Il existe dans l'art antérieur des procédés de fabrication de synthons chiraux énantiomériquement purs utilisant des enzymes d'origines végétales ou microbiennes. Toutefois, la plupart de ces procédés décrits sont difficilement transposables à l'échelle industrielle. Il est donc très intéressant de disposer d'un procédé industriel permettant d'accéder aux synthons chiraux énantiomériquement purs souhaités.
- La présente invention concerne un nouveau procédé de fabrication de synthons chiraux comprenant un groupement hydroxyle libre et un groupement hydroxyle protégé par une fonction ester, en utilisant une lipase provenant des bactéries Gram-négatif *Alcaligenes spp.*
- Le procédé de fabrication consiste en une transestérification enzymatique d'un composé diol par une lipase et un agent d'acylation, par exemple, de la manière suivante :



L'utilisation de la lipase permet ainsi d'obtenir une réaction de transestérification du composé (I) avec des performances supérieures à celles obtenues avec une enzyme d'origine animale, avec des quantités nettement plus faibles.

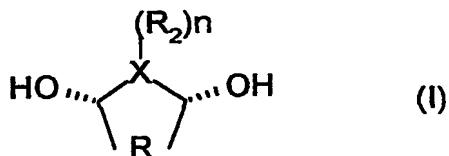
A partir du composé de formule (II) de l'invention il est possible de fabriquer des médicaments et produits pharmaceutiques en utilisant ce composé comme intermédiaire.

La présente invention à pour premier objet un procédé pour la fabrication d'un 5 composé de formule (II) :



dans lequel :

- R est une liaison covalente ou une chaîne hydrocarbonée comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; préférentiellement de 1 à 5 atomes de carbone ;
- 10 - R<sup>1</sup> est un groupe hydrocarboné comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; préférentiellement de 1 à 6 atomes de carbone ;
- R<sup>2</sup> correspond à un atome d'hydrogène ; n est un nombre entier compris entre 0 et 2, c'est à dire 0, 1 ou 2 ;
- X est un atome choisi dans le groupe comprenant : le carbone, l'azote, 15 l'oxygène, et le soufre, préférentiellement le carbone ;
- comportant au moins les étapes suivantes :
- a) on fait réagir au moins un composé de formule (I) :



avec un agent d'acylation dans un solvant organique en présence d'une lipase de la classe EC 3.1.1.3 du genre (genus) *Alcaligenes spp*, de façon à former le 20 composé de formule (II) ;

- b) on isole le composé de formule (II).

La présente invention a également pour objet un composé de formule (II) susceptible d'être obtenu par le procédé tel que décrit précédemment. La

présente invention a aussi pour objet une composition susceptible d'être obtenue par le procédé tel que décrit précédemment.

Les lipases utilisées selon l'invention sont des lipases de la classe EC 3.1.1.3 du genre (genus) *Alcaligenes spp*. Le genre *Alcaligenes spp*, de la famille

5 Alcaligenaceae comprend plusieurs espèces, telles que par exemple : *Alcaligenes aestus*, *Alcaligenes aquamarinus*, *Alcaligenes cupidus*, *Alcaligenes defragrans*, *Alcaligenes denitrificans*, *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes faecalis*, *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes pacificus*, *Alcaligenes paradoxus*, *Alcaligenes piechaudii*, *Alcaligenes ruhlandii*, *Alcaligenes venustus*, *Alcaligenes xylosoxidans*.

10 On peut utiliser selon le procédé de l'invention différentes lipases conformes à l'invention.

Les lipases de l'invention peuvent être obtenues à partir de culture d'*Alcaligenes spp*. Les conditions de culture peuvent varier en fonction du type de souche utilisées. Il est recommandé de choisir ces conditions de façon à produire les

15 lipases de la manière la plus avantageuse possible. La température de culture est généralement comprise entre 5 et 50°C. La période de culture est généralement comprise entre 1 et 10 jours.

La récupération des lipases d'*Alcaligenes spp* peut être réalisée de différentes manières bien connues de l'homme du métier. Il est par exemple possible de 20 procéder à une séparation des bactéries et du milieu de culture, notamment par centrifugation ou filtration, et ensuite procéder à une purification des lipases. Par exemple, la purification des lipases peut être réalisée par précipitation, lyophilisation, chromatographie échangeuse d'ions, immuno-affinité à l'aide d'anticorps mono- ou polyclonaux spécifiques, et/ou dialyse. On peut également 25 recueillir les lipases d'*Alcaligenes spp* par destruction des bactéries, par exemple par sonication et récupération du broyat, ou par une lyse enzymatique des parois cellulaires. Les lipases de l'invention peuvent notamment être purifiées à partir des souches d'*Alcaligenes spp* par ajout de sels, en utilisant par exemple du sulfate d'ammonium, passage dans une chromatographie échangeuse d'ions et 30 ensuite filtration sur gel.

Il est bien entendu que des lipases naturelles, synthétiques mutées, chimériques et/ou recombinantes provenant d'*Alcaligenes spp* peuvent être utilisées dans le procédé selon l'invention, dans la mesure où leur activité de transestérification vis à vis des substrats de l'invention est conservée, voir améliorée. Ainsi, des 5 lipases mutées d'*Alcaligenes spp* exprimées par d'autres micro-organismes ou produites par synthèse chimique sont également concernées par la présente invention.

Préférentiellement, les lipases d'*Alcaligenes spp* utilisées selon l'invention permettent d'obtenir les paramètres suivants :

- 10 - Excès énantiomérique en composé (II) supérieur ou égal à 50 %, préférentiellement supérieur ou égal à 70 %, particulièrement supérieur ou égal à 90 % ; tout particulièrement égal à 100 %.
- Sélectivité en composés (II) et (III) supérieure ou égale à 2, préférentiellement supérieure ou égale à 2,5, particulièrement supérieure ou 15 égale à 3,3 ;
- Rendement en composé (II) supérieur ou égal à 40 %, préférentiellement supérieur ou égal à 50 % ; particulièrement supérieure ou égale à 75 % ; et
- Taux de transformation ou conversion du composé (I) supérieur ou égal à 70 %, préférentiellement supérieur ou égal à 90 %, particulièrement supérieur ou 20 égal à 95 %.

Pour déterminer ces paramètres, on peut procéder au test suivant : dans un réacteur de 100 mL, on introduit sous agitation 4,21 g (0,0421 mol) de 1,3-dihydroxycyclopent-2-ène (correspondant au composé (I)), ci-après appelé diol, dans 30 mL d'acétone (23,7 g) à température ambiante (24-25 °C). Après 25 solubilisation du 1,3-dihydroxycyclopent-2-ène dans l'acétone, on ajoute 18,08 g (0,215 mol; 5 équivalents molaires par rapport au diol) d'acétate de vinyle, puis 420 µL (10 % en poids par rapport au diol) d'eau déminéralisée. La température du milieu est alors fixée à 5°C. On ajoute 5 % en poids d'enzyme lipase de la classe EC 3.1.1.3 d'*Alcaligenes spp* par rapport au diol. Au bout de 12 heures, on 30 effectue un prélèvement de 0,5 mL de milieu réactionnel que l'on centrifuge. 200 µL sont prélevés et dilués dans 800 µL d'acétone avant injection en

chromatographie en phase gazeuse chirale. On mesure ensuite les caractéristiques mentionnées précédemment comme expliqué dans la partie expérimentale.

Ce test permet à l'homme du métier de déterminer les lipases de la classe EC

- 5 3.1.1.3, provenant du genre *Alcaligenes spp* et/ou leurs fragments qui ont une activité conforme à l'invention.

Préférentiellement, les lipases utilisées selon le procédé de l'invention présentent une séquence d'acides aminés ayant un pourcentage d'homologie supérieur ou égal à 80 %, notamment 90 %, de préférence 95, plus préférentiellement 100 %

- 10 avec la séquence d'acides aminés de la lipase QL d'*Alcaligenes sp* PL-266, enregistrées sous le numéro FERM-P N°3187, la protéine ayant une activité de transestérification sur les substrats de l'invention. Les lipases utilisées selon le l'invention peuvent provenir de séquences nucléotidiques présentant un pourcentage d'homologie supérieur ou égal à 80 %, notamment 90 %, de préférence 95, plus préférentiellement 100 % avec la séquence nucléotidique du gène de la lipase QL d'*Alcaligenes sp* PL-266, enregistrées sous le numéro FERM-P N°3187, la lipase obtenue ayant une activité de transestérification sur les substrats de l'invention.

Il est entendu que le terme homologie se réfère à la ressemblance parfaite ou

- 20 identité entre les acides aminés comparés mais aussi à la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Les séquence d'acides aminés peuvent différer de la séquence de référence par substitution, délétion et/ou insertion d'un ou de plusieurs acides aminés, de préférence d'un nombre réduit d'acides aminés, notamment par substitution d'acides aminés naturels par des acides aminés non naturels ou pseudo-acides aminés, à des positions telles que ces modifications ne portent pas significativement atteinte à l'activité biologique de la protéine. L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 25 1710 University Avenue, Madison, WI 53705 ; ou BLAST software du National

Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894).

Les séquences d'acides aminés des lipases naturelles, synthétiques mutées, chimériques et/ou recombinantes peuvent être de la même longueur que les 5 séquences de référence.

Il en entendu selon l'invention que les lipases de la classe EC 3.1.1.3 peuvent provenir des bactéries du genre d'*Alcaligenes spp*. Toutefois, par exemple dans le cadre de procédé industriel de fabrication de ces lipases, il est possible que celles-ci soient produite par des cellules hôtes ou par des processus chimiques.

10 Les séquences nucléotidiques conduisant à la synthèse des lipases naturelles, synthétiques mutées, chimériques et/ou recombinantes peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent 15 être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation ou la transformation au chloride de calcium, polyéthylène glycol ou la fusion de protoplastes. Les signaux contrôlant l'expression, ou la sur-expression, des séquences nucléotidiques (promoteurs, activateurs, séquences de terminaison...) sont choisis en fonction de l'hôte 20 cellulaire utilisé. Les cellules hôtes peuvent être transfectées de manière transitoire ou stable, par ces vecteurs d'expression. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes, procaryotes ou eucaryotes. Des exemples de cellules hôtes incluent notamment des cellules de mammifères, telles que les cellules 293, CMV (cellule de cytomegalovirus), des cellules 25 d'insectes telles que les cellules dérivées d'ovaire de *Spodoptera frugiperda* ou cellules d'embryons de *Drosophila melanogaster*, des bactéries telles que *E. coli*, *B. subtilis* et des souches de levures telles que *Saccharomyces cerevisiae*.

Les lipases de l'invention peuvent également être produites par synthèse chimique. A cet effet, on peut recourir à n'importe quelle méthode bien connue de 30 l'homme du métier. Le peptide de l'invention peut par exemple être synthétisé par les techniques de la chimie de synthèse, telles que la synthèse de type Merrifield

- qui est avantageuse pour des raisons de pureté, de spécificité antigénique, d'absence de produits secondaires non désirés et pour sa facilité de production. La synthèse chimique permet notamment de produire des séquences nucléotidiques ou d'acides aminés, comportant éventuellement des substitutions, 5 délétions et/ou insertions par rapport à une séquence de référence.
- On peut encore utiliser directement dans le procédé, des cellules entières d'*Alcaligenes spp*, éventuellement recombinées de manière à sur-exprimer les lipases à un niveau satisfaisant. A cet effet, on peut insérer dans le génome du micro-organisme une ou plusieurs cassettes d'expression contenant la séquence 10 nucléotidique exprimant les lipases de l'invention, sous la dépendance d'un ou des élément(s) permettant son expression ou la régulation de son expression; tels que notamment des promoteurs, activateurs et/ou terminateurs de transcription.
- A titre d'exemple, on peut notamment utiliser la lipase QL d'*Alcaligenes sp* PL- 15 266, enregistrée sous le numéro FERM-P N°3187 (également appelé QLM) mentionnée par exemple dans le brevet JP 58-36953, ou la lipase PL d'*Alcaligenes sp* PL-679, enregistrée sous le numéro FERM-P N°3783, mais également ATCC 31371 et DSM 1239, mentionnée par exemple dans le brevet JP 60-15312.
- 20 La lipase peut être immobilisée sur un support solide approprié ou non immobilisée. Le support solide peut être choisi dans le groupe comprenant : le DEAE cellulose, le DEAE sepharose, la diatomée, la silice, l'alumine, le polypropylène, les particules céramiques et/ou leurs mélanges.
- Comme lipases de la classe EC 3.1.1.3 d'*Alcaligenes spp*, on peut notamment 25 utiliser la Chirazyme™ L-10 commercialisée par la société Roche ou les lipases QL (ou QLM), QLC, QLG, PL, PLC et PLG commercialisées par la société Meito-Sangyo. Les lipases PLC et PLG correspondent respectivement à la lipase PL immobilisée sur diatomée et sur granulés de terres de diatomée. Les lipases QLC et QLG correspondent respectivement à la lipase QL immobilisée sur diatomée et 30 sur granulés de terres de diatomée.

De nombreux substrats de formule (I) peuvent être monoacylés selon le procédé de la présente invention.

Le groupement R peut être une liaison covalente ou une chaîne hydrocarbonée comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, préférentiellement de 1 à 5 atomes de carbone, saturée ou insaturée, linéaire ou branchée, aliphatique, cyclique et/ou aromatique, pouvant comprendre et/ou former un ou plusieurs cycles, éventuellement aromatique. Cette chaîne hydrocarbonée peut éventuellement comprendre un ou plusieurs hétéroatomes choisi(s) dans le groupe comprenant le carbone, l'azote, le phosphore, l'oxygène, le silicium et le soufre.

10 Si R est une liaison covalente, le composé de formule (I) sera un composé dérivé du cyclopropane.

Préférentiellement, R est une chaîne hydrocarbonée comprenant au moins une insaturation. R peut être une chaîne hydrocarbonée comprenant un ou plusieurs cycle(s) aromatique(s) ou non-aromatique(s).

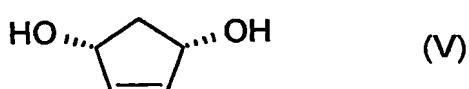
15 Par exemple, si le composé de formule (I) est le cis-4-cyclopentene-1,3-diol, le groupement R correspond à une chaîne hydrocarbonée insaturée comprenant 2 atomes de carbone.

Le groupement  $R^2n$  est dépendant de la valence de l'atome X. Par exemple, si X est l'atome de carbone,  $R^2=H$  et  $n=2$ . Si X est l'atome d'oxygène ou de soufre,

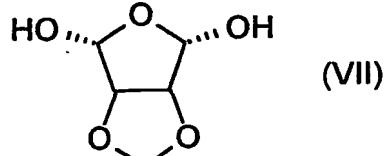
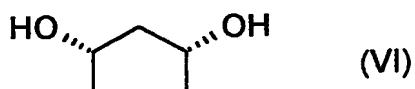
20  $R^2=H$  et  $n=0$ . De même si X est un atome d'azote,  $R^2=H$  et  $n=1$ .

Préférentiellement, le composé de formule (I) est choisi dans le groupe comprenant choisi dans le groupe comprenant les composés de formule (V), (VI) et/ou (VII) :

25



30



Le substrat préféré selon l'invention est le cis-4-cyclopentene-1,3-diol. Le composé de formule (II) obtenu à partir de ce substrat selon le procédé de l'invention est le (1R, 4S)-4-acétoxy-cyclopent-2-èn-1-ol.

- 5 La lipase isolée peut être employée en solution aqueuse, éventuellement tamponnée, dans des solvants organiques, en solution mono-phasique ou bi-phasique.

Différents types de solvants organiques peuvent être utilisés selon la présente invention. Le solvant est par définition capable de dissoudre, au moins 10 partiellement, le substrat, tel que le composé de formule (I). On préfère notamment un solvant organique miscible à l'eau. Le solvant organique peut être un composé hydrocarboné aliphatique, cyclique ou aromatique, comprenant éventuellement des fonctions chlorés, azotés, acides, cétone, nitrile aldéhyde et/ou ester.

- 15 Le solvant organique est préférentiellement choisi dans le groupe comprenant : les cétones telle que l'acétone, la méthyléthylcétone, la cyclohexanone, la cyclopentanone, et la méthylisobutylcétone (MIBK) ; les éthers tel que le méthyleter, tertiobutyle éther (MTBE) et le tétrahydrofurane (THF) ; les nitriles tel que l'acétonitrile ; et les composés aromatiques tel que le toluène.

20 Préférentiellement, le solvant est compatible avec la lipase de l'invention, c'est à dire qu'il ne dégrade pas la protéine et/ou qu'il ne diminue pas son activité biologique vis à vis du procédé de l'invention de plus de 30 %, mesuré par exemple par rapport au rendement, l'excès énantiomérique en composé (II), le taux de transformation ou conversion du composé (I) et/ou la sélectivité.

- 25 Outre le solvant organique, le milieu réactionnel, notamment celui de l'étape a), peut comprendre de l'eau, par exemple de 0,1 et 30 % en poids d'eau par rapport au poids du composé de formule (I), préférentiellement de 5 à 20 % en poids d'eau, notamment de 5 à 30 % en poids d'eau.

On entend par agent d'acylation, un composé capable de réagir avec une 30 fonction hydroxyle du composé (I) de façon à protéger celui-ci par l'intermédiaire d'une fonction ester.

L'agent d'acylation peut être notamment un ester, un anhydre ou un carbonate.

L'agent d'acylation peut être un composé de formule (VIII) :



dans laquelle :

- 5 -  $\text{R}^1$  est défini précédemment ; et
- $\text{R}^3$  est un groupe hydrocarboné comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, éventuellement linéaire, cyclique, aromatique, ramifié, saturé et/ou insaturé ; et comprenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, tel que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou le chlore.  $\text{R}^3$  est de préférence un groupe alkyle comprenant de 1 à 6 atomes de carbone, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes de fluor, ou un groupe alcényle comprenant de 2 à 6 atomes de carbone.

10  $\text{R}^1$  peut être un groupe hydrocarboné comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; préférentiellement de 1 à 6 atomes de carbone ; éventuellement linéaire, cyclique, aromatique et/ou ramifié et comprenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, tel que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou le chlore.  $\text{R}^1$  peut être choisi dans le groupe comprenant le méthyle, l'éthyle, le propyle, le phényle et l'isopropyle.

15 Cet agent d'acylation peut être choisi dans le groupe comprenant : les acétates, les benzoates et les isobutyrates.

L'agent d'acylation est préférentiellement choisi dans le groupe comprenant : l'acétate de vinyle, l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isopropyle, l'acétate de 2,2,2-trifluoroéthyle, et l'acétate d'isopropényle.

L'agent d'acylation peut également être utilisé comme solvant organique.

20 Selon le procédé de l'invention, la proportion d'agent d'acylation est préférentiellement supérieur à 1 mole équivalent par rapport composé de formule (I), préférentiellement compris entre 2 et 6 mole équivalent, plus préférentiellement compris entre 1 et 10 moles équivalent.

25 Le milieu réactionnel peut être obtenu par mélange du composé de formule (I), et éventuellement l'agent d'acylation au solvant, et ensuite ajout de la lipase de l'invention. On peut également obtenir le milieu réactionnel par ajout successifs

des produits suivants : composé de formule (I), lipase, solvant et enfin ajout de l'agent d'acylation.

Les concentrations optimales en enzyme peuvent être déterminées pour chaque substrat et peuvent varier dans d'assez larges proportions. Selon le procédé de

- 5 l'invention, la proportion de lipase peut être comprise entre 0,1 à 30 % en poids par rapport au poids du composé de formule (I), préférentiellement de 0,1 à 20 % en poids, particulièrement de 0,5 à 10 % en poids.

La réaction de catalyse enzymatique de l'étape a) s'effectue préférentiellement à une température comprise entre -5 et 40 °C, préférentiellement entre 1 et 15 °C.

- 10 Pour chaque substrat, il est possible de déterminer à l'avance et/ou de contrôler en continu la durée de la réaction enzymatique, en fonction du composé de formule (I) utilisé. Un homme du métier est parfaitement à même de déterminer facilement les conditions de durée optimales pour un substrat donné. Ceci peut être réalisé en réalisant des prélèvements réguliers du milieu réactionnel sur  
15 lesquels on évalue l'évolution de l'excès énantiomérique et le taux de conversion. La durée de la réaction enzymatique de l'étape a) est généralement comprise entre 1 et 24 heures, préférentiellement entre 4 et 16 heures.

La réaction enzymatique est conduite dans un réacteur approprié éventuellement muni de moyens d'agitation ou de mélanges adaptés.

- 20 La réaction enzymatique peut notamment être arrêtée par tout moyen chimique approprié, tel que par ajout d'un solvant, addition de base ou d'acide, de détergents, et/ou de sels ; ou moyen physique approprié, comme par exemple par congélation, centrifugation, chauffage, et/ou filtration.

- 25 Selon l'étape b), le composé de formule (II) peut être isolé de différentes manières connues de l'homme du métier, tel que par exemple par purification par filtration, extraction, distillation, cristallisation, chromatographie sur colonne, et/ou centrifugation. On peut notamment procéder en fin de réaction à une filtration, suivie d'une ou plusieurs distillations et d'une cristallisation avant filtration.

- 30 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un composé de formule (II) obtenu par un procédé de fabrication tel que défini précédemment, en tant qu'intermédiaire, pour la fabrication d'un médicament ou d'un produit

pharmaceutique, tel que prostaglandines, des prostacyclines et/ou des thromboxanes. A partir du composé de formule (II) de l'invention, il est possible de fabriquer des médicaments et produits pharmaceutiques en utilisant ce composé comme intermédiaire. Ainsi, par exemple, l'utilisation du (1R, 4S)-4-acétoxy-cyclopent-2-ène-1-ol, correspondant à un composé de formule (II) est utilisée pour la synthèse de produits pharmaceutiques, comme mentionné dans le brevet WO9526729 et les publications suivantes : J. Stjenschantz et al. Drugs of the Future, 1992, 17, 691 ; Noyori et al. Angew. Chem. Int. Ed., 1984, 23, 847 ; Kaumen et al. J. Chem. Soc., Chem. Comm., 1986, 1298 ; Kondo et al. Angew. Chem. Int. Ed., 1975, 14, 103 ; Tömösközi et al. Tetrahedron Lett., 1976, 4639.

On donne ci-après des exemples de réalisation pratique de l'invention. Les exemples suivent illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

Exemple 1 :

15 Matériaux utilisés :

- Lipase d'*Alcaligenes sp.* : GLG, QLC ou QL commercialisées par la société Meito-Sangyo ; ou Chirazyme L10™ commercialisée par la société Roche (ci-après appelé L10) ;
- Lipase Pancréatine : Pancréatine de porc commercialisée par la société Sigma ;
- Substrat diol : cis-4-cyclopentene-1,3-diol commercialisé par la société Fluka (composé de formule (I)).

Dans un réacteur de 100 mL, on introduit sous agitation 4,21g (0,042 mol) de 1,3-dihydroxycyclopent-2-ène dans 30 mL d'acétone (23,7g) à température ambiante (24-25°C). Après solubilisation du diol dans l'acétone, on ajoute 18,08g d'acétate de vinyle (0,21 mol; 5 équivalents molaires par rapport au diol) puis 420µL (10 % en poids par rapport au diol) d'eau déminéralisée. La température du milieu est alors fixée à 5°C.

On ajoute 100 % en poids d'enzyme Pancréatine par rapport au diol ou un pourcentage en poids déterminé d'enzyme lipase d'*Alcaligenes sp* par rapport au diol. Au bout de 6,5 heures, on effectue un prélèvement de 0,5 mL de milieu

réactionnel que l'on centrifuge. 200 µL sont prélevés et dilués dans 800 µL d'acétone avant injection en chromatographie en phase gazeuse chirale.

Le reste du milieu réactionnel est filtré de manière à séparer la lipase ; le gâteau est lavé avec env. 3 g d'acétone. Le filtrat auquel on a ajouté environ 8 g de  
5 TMBE (tertiobutyle méthyle éther) est ensuite distillé sous vide de façon à éliminer l'acétone et l'acétate de vinyle. On ajoute à la fin de cette première dévolatilisation environ 15 g de TMBE et du charbon actif. On agite et on filtre le milieu réactionnel sur du clarsel. Le filtrat est dévolatilisé. On ajoute ensuite de l'heptane pour cristalliser le produit souhaité et on diminue la température de 28  
10 à 8°C. Le début de la cristallisation est observé vers 16°C. On filtre ensuite le composé souhaité qui se présente sous forme de cristaux blancs. Les cristaux comprenant le monoacétate R (composé III) et le monoacétate S (composé II) sont séchés sous 50 mbar à température ambiante durant 18 heures.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est réalisée à l'aide d'une colonne  
15 Cyclodex B composée de  $\beta$ -cyclodextrine perméthylée déposée dans une huile silicone constituée à 86% de motifs diméthylsiloxane et de 14 % de motifs méthyl-cyanopropylsiloxane. La colonne possède une longueur de 30 m, un diamètre interne de 250 µm et une épaisseur de film d'huile silicone de 0,25 µm.  
20 Le diol (composé (I)) est élué avec un temps de rétention relatif de 1,00, le monoacétate R (composé (III)) de 1,10, le monoacétate S (composé (II)) de 1,13 et le diacétate composé (IV) de 1,38.

On mesure ensuite le pourcentage surface des pics extraits de la chromatographie pour les composés (I), (II), (III) et (IV). Les résultats sont mentionnés dans le tableau I :

Tableau I

	Pan-creatine	QLG	QLG	QLG	QLG	QLC	QL	L10
Taux de transformation ou conversion du composé (I) (%)	20	78,9	88,6	93,5	98,5	98,7	99	99
Excès énantiomérique en composé (II) (%)	67	80	74	87	94	94	97	97
Sélectivité	10,3	7,1	5,6	4,8	3,9	3,9	3,3	3,5
Rendement en composé (II) (%)	16,5	61,9	69,1	72,5	75,8	76,4	75,5	76,4
Temps de réaction (heures)	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Quantité d'enzyme (en % poids par rapport au diol)	100	3,6	5,3	7,0	10,0	10,0	5,0	5,0

Le taux de transformation ou conversion du composé (I) (%) est calculé de la manière suivante : (pourcentage surface du composé (I) au temps 0 (début de la réaction) – le pourcentage surface du composé (I) en fin de réaction) / pourcentage surface du composé (I) au temps 0.

L'excès énantiomérique en composé (II) (%) est calculé de la manière suivante : (valeur absolue du (pourcentage surface du composé (II) – pourcentage surface

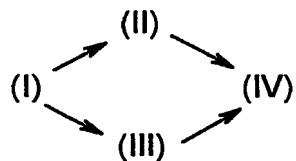
de composé (III))) / (pourcentage surface du composé (II) + pourcentage surface de composé (III)).

La sélectivité est calculée de la manière suivante : Il correspond au (pourcentage surface des composés (II) + (III)) / (pourcentage surface du composé (IV)).

- 5 Le rendement en composé (II) (%) est calculé de la manière suivante : (pourcentage surface du composé (II)) / (pourcentage surface du composé (I) au temps 0).

On observe ainsi que l'utilisation de la lipase permet d'obtenir une réaction de transestérification du diol pour obtenir un composé (II) avec des performances 10 supérieures à celles obtenues avec une enzyme d'origine animale, avec des quantités nettement plus faibles.

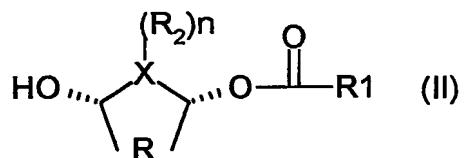
Comme il se produit un schéma réactionnel du type :



- la faible quantité de composé (IV) obtenue en fin de réaction en utilisant l'enzyme 15 pancréatine entraîne une mesure de sélectivité importante.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la fabrication d'un composé de formule (II) :



5 dans lequel :

- R est une liaison covalente ou une chaîne hydrocarbonée comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ;

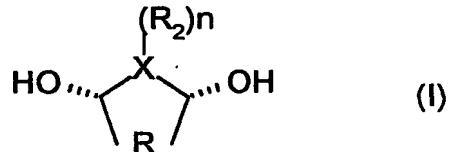
- R<sup>1</sup> est un groupe hydrocarboné comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ;
- R<sup>2</sup> correspond à un atome d'hydrogène ; n est un nombre entier compris

10 entre 0 et 2 ;

- X est un atome choisi dans le groupe comprenant le carbone, l'azote, l'oxygène, et le soufre ;

comportant au moins les étapes suivantes :

a) on fait réagir au moins un composé de formule (I) :



15 avec un agent d'acylation dans un solvant organique en présence d'une lipase de la classe EC 3.1.1.3 d'*Alcaligenes spp*, de façon à former le composé de formule (II) ;

b) on isole le composé de formule (II).

20 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la lipase de la classe EC 3.1.1.3 présentent les caractéristiques suivantes :

- Excès énantiomérique en composé (II) supérieur ou égal à 50 % ;
- Sélectivité en composés (II) et (III) supérieure ou égale à 2 ;
- Rendement en composé (II) supérieur ou égal à 40 % ; et

- Taux de transformation ou conversion du composé (I) supérieur ou égal à 70 %.

3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce  
5 que la lipase est choisie dans le groupe comprenant : la lipase QL d'*Alcaligenes* sp PL-266, enregistrées sous le numéro FERM-P N°3187, et la lipase PL d'*Alcaligenes* sp PL-679, enregistrées sous le numéro FERM-P N°3783.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce  
10 que la lipase est immobilisée sur un support solide approprié ou non immobilisée.

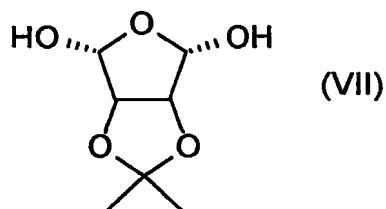
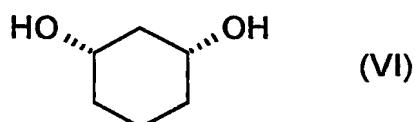
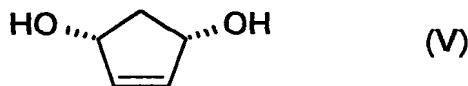
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le support solide est  
choisi dans le groupe comprenant : le DEAE cellulose, le DEAE sepharose, la  
diatomée, la silice, l'alumine, le polypropylène et/ou leurs mélanges.

15

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce  
que la lipase est choisie dans le groupe comprenant : les lipases QL, QLC, QLG,  
PL, PLC et PLG.

20 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce  
que R est une chaîne hydrocarbonée comprenant au moins une insaturation.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le composé de formule (I) est choisi dans le groupe comprenant les composés de formule (V), (VI) et/ou (VII) :



5 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la proportion de lipase est comprise entre 0,1 à 30 % en poids par rapport au poids du composé de formule (I).

10 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le solvant organique est choisi dans le groupe comprenant : les cétones telle que l'acétone, la méthyléthylcétone, la cyclohexanone, la cyclopentanone, et la méthylisobutylcétone (MIBK) ; les éthers tel que le méthyle tertiobutyle éther (MTBE) et le tétrahydrofurane (THF) ; les nitriles tel que l'acétonitrile ; et les composés aromatiques tel que le toluène.

15

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le milieu réactionnel de l'étape a) comprend de l'eau.

20 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'agent d'acylation est un composé de formule (VIII) :



dans laquelle :

- $R^1$  est défini précédemment ; et
- $R^2$  est un groupe hydrocarboné comprenant de 1 à 10 atomes de carbone.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce  
5 que l'agent d'acylation est choisi dans le groupe comprenant : les acétates, les  
benzoates et les isobutyrates.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce  
que l'agent d'acylation est choisi dans le groupe comprenant : l'acétate de vinyle,  
10 l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isopropyle, l'acétate de 2,2,2-trifluoroéthyle, et  
l'acétate d'isopropényle.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce  
que la réaction de l'étape a) s'effectue à une température comprise entre -5 et 40  
15 °C.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce  
que la durée de la réaction enzymatique de l'étape a) est comprise entre 1 et 24  
heures.

20 17. Utilisation d'un composé de formule (II) obtenu selon le procédé selon l'une  
quelconque des revendications 1 à 16 en tant qu'intermédiaire, pour la  
fabrication d'un médicament ou d'un produit pharmaceutique.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/002665

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12P7/62 A61K31/21 A61K31/33

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data, EMBASE, FSTA

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DD 290 662 A (VE FORSCHUNGSZENTRUM BIOTECHNO) 6 June 1991 (1991-06-06) the whole document	1-16
Y	KOKUSHO Y ET AL: "STUDIES ON ALKALINE LIPASE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LIPASE PRODUCING MICROORGANISMS" AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 46, no. 5, 1982, pages 1159-1164, XP001189617 ISSN: 0002-1369 abstract	1-16
P, X	EP 1 428 888 A (CLARIANT GMBH) 16 June 2004 (2004-06-16) the whole document	1-17 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

9 March 2005

Date of mailing of the International search report

23/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/002665

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 09 206093 A (CHISSO CORP) 12 August 1997 (1997-08-12) -----	
A	GHORPADE S R ET AL: "Desymmetrization of meso-cyclopenten-cis-1,4-diol to 4-(R)-hydroxycyclopent-2-en-1-(S)-acetate by irreversible transesterification using Chirazyme<(>R)" TETRAHEDRON: ASYMMETRY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 10, no. 5, 12 March 1999 (1999-03-12), pages 891-899, XP004162512 ISSN: 0957-4166 -----	
A	HENLY R ET AL: "The influence of protecting groups on lipase catalyzed transesterifications: Enzymatic resolution of racemic cis-1,3-cyclopentanediol derivatives" TETRAHEDRON LETTERS, vol. 34, no. 18, 1993, pages 2923-2926, XP002284057 ISSN: 0040-4039 -----	
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198750 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 1987-352974 XP002284058 & JP 62 257396 A (SUMITOMO CHEM IND KK) 9 November 1987 (1987-11-09) abstract -----	

## Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR2004/002665

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
DD 290662	A	06-06-1991	DD	290662 A5		06-06-1991
EP 1428888	A	16-06-2004	EP	1428888 A1		16-06-2004
			JP	2004194656 A		15-07-2004
			US	2004126855 A1		01-07-2004
JP 9206093	A	12-08-1997		NONE		
JP 62257396	A	09-11-1987	JP	1920942 C		07-04-1995
			JP	6048989 B		29-06-1994

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No

PCT/FR2004/002665

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12P7/62 A61K31/21 A61K31/33

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12P A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data, EMBASE, FSTA

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	DD 290 662 A (VE FORSCHUNGSZENTRUM BIOTECHNO) 6 juin 1991 (1991-06-06) Le document en entier	1-16
Y	KOKUSHO Y ET AL: "STUDIES ON ALKALINE LIPASE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LIPASE PRODUCING MICROORGANISMS" AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 46, no. 5, 1982, pages 1159-1164, XP001189617 ISSN: 0002-1369 abrégé	1-16
P, X	EP 1 428 888 A (CLARIANT GMBH) 16 juin 2004 (2004-06-16) Le document en entier	1-17 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 mars 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/03/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2004/002665

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	JP 09 206093 A (CHISSO CORP) 12 août 1997 (1997-08-12) -----	
A	GHORPADE S R ET AL: "Desymmetrization of meso-cyclopenten-cis-1,4-diol to 4-(R)-hydroxycyclopent-2-en-1-(S)-acetate by irreversible transesterification using Chirazyme<(>R)" TETRAHEDRON: ASYMMETRY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 10, no. 5, 12 mars 1999 (1999-03-12), pages 891-899, XP004162512 ISSN: 0957-4166 -----	
A	HENLY R ET AL: "The influence of protecting groups on lipase catalyzed transesterifications: Enzymatic resolution of racemic cis-1,3-cyclopentanediol derivatives" TETRAHEDRON LETTERS, vol. 34, no. 18, 1993, pages 2923-2926, XP002284057 ISSN: 0040-4039 -----	
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198750 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 1987-352974 XP002284058 & JP 62 257396 A (SUMITOMO CHEM IND KK) 9 novembre 1987 (1987-11-09) abrégé -----	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document de Internationale No

PCT/FR2004/002665

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DD 290662	A 06-06-1991	DD 290662 A5	06-06-1991
EP 1428888	A 16-06-2004	EP 1428888 A1 JP 2004194656 A US 2004126855 A1	16-06-2004 15-07-2004 01-07-2004
JP 9206093	A 12-08-1997	AUCUN	
JP 62257396	A 09-11-1987	JP 1920942 C JP 6048989 B	07-04-1995 29-06-1994